UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1950 **N° 30**

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES BACILLES TUBERCULEUX RESISTANT A LA STREPTOMYCINE ET AU P. A. S.

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1950

par

ANDRÉ DELAUDE
INTERNE DES HOPITAUX

MEMBRES DU JURY :

MM. TAPIE — Président
ANDRIEU, FABRE P., BAUDOT — Assesseurs
LAPORTE — Suppléant

1950

IMPRIMERIE REISE - 2 RUE DE LA JEUNESSE - TOULOUSE - 1950

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES

BACILLES TUBERCULEUX
RÉSISTANT A LA STREPTOMYCINE ET AU P. A. S.

UNIVERSITE DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1950 **N° 30**

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES BACILLES TUBERCULEUX RESISTANT A LA STREPTOMYCINE ET AU P. A. S.

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1950

par

ANDRÉ DELAUDE
INTERNE DES HOPITAUX

MEMBRES DU JURY :

MM. TAPIE — Président
ANDRIEU, FABRE P., BAUDOT — Assesseurs
LAPORTE — Suppléant

IMPRIMERIE REISE - 2 RUE DE LA JEUNESSE - TOULOUSE - 1950

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen	MM.	LEFEBVRE.
Assesseur		BRUSTIER.
Doyens honoraires		GORSE, CALVET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. RISPAL. LAFFORGUE. — MM. MÉRIEL. VALLOIS — MM. RIBAUT. SERR.

PROFESSEURS

Clinique de neurologie et psychiatrie	MM.	RISER.
Clinique médicale		TAPIE (J.), ROQUES.
Clinique obstétricale		GUILHEM.
Physiologie		SOULA.
Clinique chirurgicale et du cancer		DUCUING.
Physique biologique et médicale		BUGNARD.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques		NANTA.
Chimie et Toxicologie		BRUSTIER.
Pathologie générale et médecine expérimentale		SENDRAIL.
Clinique chirurgicale et gynécologique		LEFEBVRE.
Anatomie		LAZORTHES.
Histoire naturelle		DELAS.
Clinique médicale infantile et puériculture		SOREL (R.).
Pharmacie		CAUJOLLE.
Pathologie interne et Clinique des Maladies de la Tuberculose		MOREL.
Bactériologie, hygiène et médecine sociale		ANDRIEU.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie		VIRENQUE.
Clinique des Maladies des Voies urinaires		FABRE (P.).
Matière médicale		VINCENT.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		MÉRIEL.
Anatomie Pathologique		FABRE (J.).
Clinique oto-rhino-laryngologique et Chirurgie maxillo-faciale		CALVET.
Clinique ophtalmologique		CALMETTES.
Chimie Biologique		VALDIGUIÉ (P.).
Médecine légale et du Travail		PLANQUES.
Histologie et Embryologie		BROUSSY.
Médecine Sociale		BOUNHOURE.
Thérapeutique		GADRAT.
Pathologie externe		GRIMOUD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie	MM.	BAISSET.
Anatomie		COULOUMA.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie	MM.	POULHÈS.
Histologie		BIMES.
Sciences Naturelles		BOUISSET.
Bactériologie	Mme	ENJALBERT.
Chimie Biologique	MM.	POLONOVSKI.
Physique Médicale		AUVERGNAT.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Médecine	MM.	DARNAUD, GÉRAUD, DARDENNE, LAPORTE (J.) BAUDOT.
Chirurgie		RIEUNAU, DIEULAFÉ, DAMBRIN (P.).
Ophtalmologie		DEODATI.
Physique Médicale		MARQUÈS.
Obstétrique		PONTONNIER.
Pharmacie		COUTURIER.
Chimie Générale Pharmaceutique		BLANC.
Botanique	Mme	DULUCQ-MATHOU.
Odonto-Stomatologie	MM.	CADENAT.
Oto-Rhino-Laryngologie		CLAUX.

COURS COMPLÉMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	MM.	GUILHEM.
Chimie biologique		DOUSTE-BLAZY.
Chimie minérale		BLANC.
Physique pharmaceutique		AUVERGNAT.
Dermatologie et Syphiligraphie		BAZEX.
Législation pharmaceutique		BOUISSET.
Clinique de la Tuberculose		MOREL (L.).
Chirurgie pulmonaire		DAMBRIN (P.).
Parasitologie		LASSERRE.
Cryptogamie	Mme	DULUCQ-MATHOU.
Chimie analytique	MM.	BLANC.
Hydrologie et géologie		ASTRE.
Anatomie médico-chirurgicale		THOMAS.
Pharmacodynamie		BAISSET.
Hygiène		LAPORTE.
Urologie		LHEZ.
Ophtalmologie		DEODATI.
Neuro-Chirurgie		LAZORTHES.
Mycologie		MORQUER.
Psychiatrie		GAYRAL.
Physiologie		COLOMBIÉS.

Secrétaire de la Faculté : ARGILAS.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

À NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN TAPIE

Professeur de Clinique Médicale,
Médecin en Chef des Hôpitaux.

Il m'a fait l'honneur de me compter parmi ses élèves et, me témoignant une bienveillance jamais démentie, m'a fait bénéficier de son précieux enseignement.

Il a enfin accepté de présider à l'élaboration et à la soutenance de cette thèse inaugurale. Qu'il veuille trouver ici l'hommage de mon respectueux et très affectueux attachement.

A NOTRE MAÎTRE ET AMI :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JEAN BAUDOT

Médecin Phtisiologue en Chef des Hôpitaux.

Précieux conseiller et guide vigilant de ma carrière médicale, il m'a familiarisé avec les disciplines de sa spécialité et m'a aiguillé vers les recherches expérimentales en tuberculose.

La sollicitude qu'il m'a témoignée depuis de très longues années et dans des circonstances si diverses, fait que les mots ne suffisent point à lui dire ma gratitude. Qu'il trouve seulement ici l'hommage de ma totale et indéfectible affection.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES ANDRIEU

Professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale.

Avec tous nos remerciements pour ses conseils avertis et l'aide matérielle que son laboratoire nous a apportée.

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE FABRE

Professeur de Clinique des Maladies des Voies Urinaires.

Uni à lui par des liens familiaux étroits, j'ai pu apprécier tout au long de mes études l'intérêt bienveillant qu'il n'a cessé de me témoigner. Je lui exprime ici et ma reconnaissance et mon affection.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ

JACQUES LAPORTE

En très fidèle hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BUGNARD

Directeur de l'Institut National d'Hygiène.

En hommage de profonde gratitude pour l'amitié qu'il m'a si souvent témoignée et pour m'avoir permis d'aller acquérir à la Mayo Foundation les bases et les plus précieux éléments de ce travail.

A MESSIEURS LES DOCTEURS W. H. FELDMAN ET H. G. KARLSON

de la Mayo Foundation à Rochester-Minnesota (U. S. A.).

Qui ont bien voulu nous accueillir pendant dix-huit mois dans leur laboratoire où ils nous ont prodigué leurs enseignements et leurs conseils amicaux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RISER

Professeur de Clinique Neurologique.

En hommage de bien vive reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a toujours réservé et pour l'aide si appréciable qu'il nous a apportée dans la continuation de nos travaux expérimentaux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES GADRAT

Professeur de Thérapeutique.

En témoignage de reconnaissance et de fidèle attachement.

INTRODUCTION

L'adaptation à un antibiotique ou à une médication chimique de certains germes appartenant à un groupe primitivement sensible à cet agent, est un phénomène bien connu.

Observé d'abord avec des protozoaires et des substances chimiques quelconques, ce phénomène est devenu désormais courant en bactériologie et en clinique, depuis l'apparition des sulfamidés et des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique.

L'exemple des gonocoques sulfamido-résistants et des staphylocoques résistant à la Pénicilline, est devenu bien classique. L'accoutumance des germes banaux à la Streptomycine, a suivi de près l'utilisation de cet antibiotique; elle est même plus rapide et plus intense à l'égard de cet agent, qu'à celui de ses devanciers [1].

Dès que l'efficacité de la Streptomycine en tuberculose a été prouvée, on s'est demandé si le bacille de Koch qui s'était comporté jusqu'alors d'une façon tellement particulière en face des agents thérapeutiques connus, allait encore se classer à part en ce qui concerne le problème de l'adaptation des germes. C'était là une question d'un intérêt particulièrement crucial car, d'une part, la Streptomycine était la seule médication capable d'atteindre in vivo le bacille tuberculeux, et, d'autre part, sa toxicité empêchait d'en augmenter les doses dans des proportions importantes. On était donc en droit de penser que l'on serait complètement désarmé du point de vue thérapeutique antibactérienne, le jour où un malade serait porteur de bacilles tuberculeux streptomycino-résistants.

C'est ce qui a amené YOUMANS [2] et ses collaborateurs a étudier la sensibilité à l'antibiotique, des bacilles tuberculeux isolés, chez les premiers malades qui ont reçu cette médication. Ces travaux initiaux se sont d'ailleurs montrés concluants, et

dès lors, le clinicien à su qu'il aurait à tenir compte des bacilles tuberculeux résistant à la Streptomycine.

Par la suite, le même problème s'est posé en ce qui concerne l'acide para-amino-salicylique, une fois que ses propriétés bactériostatiques sur le bacille de Koch ont été connues.

Nous avons pu nous attacher personnellement à cette question dans le laboratoire du Docteur FELDMAN, de la Mayo Foundation, et montrer que la résistance des bacilles tuberculeux à cette médication, devait être envisagée [3]. Nous avons même, au cours de ce travail, isolé des bacilles tuberculeux résistant simultanément à la Streptomycine et à l'acide para-amino-salicylique.

C'est pourquoi, sur les conseils de notre Maître, le Professeur Jean TAPIE, nous nous sommes proposé, dans notre thèse inaugurale, d'étudier :

1° Les moyens de mettre en évidence les bacilles tuberculeux résistant :

— Soit à la Streptomycine,
— Soit au P. A. S.,
— Soit à ces deux médications simultanément;

2° Les modifications éventuelles des caractères biologiques subies par ces bacilles, du fait de leur résistance;

3° Les conséquences pratiques qu'entraîne leur apparition.

Disons d'emblée que du fait d'une question de recul, indispensable en cette matière, nos observations et nos conclusions seront beaucoup plus précises en ce qui concerne les bacilles résistant à la Streptomycine, l'utilisation du P. A. S. dans notre pays étant nettement plus récente.

Rappelant nos travaux effectués à la Mayo Foundation sous la direction des Docteurs FELDMAN et KARLSON, nous rapporterons, en outre, les données récentes qu'il nous a été permis d'observer dans le Laboratoire de Bactériologie du bacille tuberculeux, qui nous a été très aimablement confié par nos Maîtres le Professeur RISER et le Professeur Agrégé Jean BAUDOT, cependant que nous rapprochions nos conclusions

biologiques des faits cliniques recueillis au cours d'une riche et fructueuse observation quotidienne dans le service de notre Maître le Professeur Jean TAPIE, à qui nous sommes heureux de dire ici une fois de plus notre profonde gratitude et notre fidèle attachement.

BACILLES TUBERCULEUX RESISTANT A LA STREPTOMYCINE

TECHNIQUES DE MISE EN ÉVIDENCE

L'ensemencement d'une même dose de bacilles tuberculeux sur des milieux liquides ou solides contenant des concentrations croissantes de Streptomycine, constitue le procédé le plus précis et le plus couramment employé.

Toutefois, certains auteurs se sont attachés à déceler la présence de bacilles streptomycino-résistants en partant du produit pathologique lui-même, et non d'une colonie déjà isolée par primo-culture; pour cela, ils ensemencent directement le produit pathologique sur milieu streptomyciné, où l'inoculent d'emblée à l'animal.

Nous allons exposer rapidement ces différentes méthodes pour nous étendre ensuite sur les tests in vitro les plus couramment employés à cause de la fidélité de leurs résultats. En particulier nous décrirons une méthode qui, avec KARLSON et NEEDHAM [4, 5] nous a donné toute satisfaction.

TESTS PRATIQUÉS DIRECTEMENT A PARTIR DU PRODUIT PATHOLOGIQUE

I. IN VITRO

Les produits pathologiques reçus au laboratoire sont ensemencés sur des milieux streptomycinés; s'il y a lieu ils sont traités par la soude pour faire disparaître les germes banaux et homogénéisés, de sorte que les bacilles tuberculeux y soient répartis de façon à peu près égale.

Bretey, Coletsos et Boisvert [6 et 7], utilisent par exemple, le milieu de Lœwenstein-Jensen, à la surface duquel ils ont fait évaporer des solutions de Streptomycine en sérum physiologique.

Hauduroy et Rosset [8], décrivent une méthode un peu différente : ils mélangent le liquide gastrique ou les crachats après homogénéisation, à deux solutions de Streptomycine de titre différent; ils ensemencent ensuite ces mélanges sur milieu de Lœwenstein et surveillent l'apparition des colonies.

Bariety et Vittoz [9], mettent le produit pathologique au contact de solutions de Streptomycine. C'est également à cette technique qu'ont recours Galland et Chabbert [10], qui facilitent la lecture des résultats en colorant précocément en noir les colonies à l'aide d'une solution de tellurite de potassium à 1/1.000e comme l'avait préconisé Sula [11].

Les méthodes sur lames sont aussi utilisées. Employées tout d'abord par Pryce [12], pour le diagnostic bactériologique précoce de tuberculose, elles furent appliquées par Muller [13] à l'étude du pouvoir bactériostatique de certains produits vis-à-vis du bacille tuberculeux. Etienne Bernard et Kreis [14] ont utilisé des méthodes semblables pour l'étude de la streptomycino-résistance. La technique en est simple : on étale soigneusement le crachat sur des lames porte-objet, on fixe et on débarrasse la préparation de la flore microbienne banale par immersion pendant 7 à 8 minutes dans une solution d'acide sulfurique à 6 %; les lames sont ensuite placées dans

des flacons contenant du milieu de Youmans ou du milieu de Dubos, pur pour le témoin, additionné de concentrations variables de Streptomycine pour les autres préparations. Au bout de sept jours on voit sur les lames, après coloration au Ziehl-Nielsen, des colonies en croissance, c'est-à-dire ayant la forme de torsades, de serpentins, de treillis — ceci dans le tube témoin — et la concentration de Streptomycine permettant l'apparition de ce phénomène, donne le degré de résistance de la souche.

Etienne BERNARD et KREIS [15] également, ont remplacé le milieu synthétique dans lequel baignent les lames, par le sang du malade dont on veut étudier les bacilles tuberculeux, prélevé avant et après injection de Streptomycine.

Ces techniques se passant de la primo-culture ont le gros avantage de donner rapidement des résultats; elles présentent cependant certains inconvénients.

Tout d'abord, il est difficile d'obtenir un produit pathologique au sein duquel les bacilles tuberculeux soient répartis de façon homogène. On s'expose donc à de grosses variations dans les doses ensemencées sur les différents tubes, ainsi que dans le nombre des bacilles présents sur les lames, si la méthode de Pryce a été utilisée. Rappelons que, en pratiquant des cultures banales, bien souvent un seul tube est positif sur les quatre ou cinq qui ont été ensemencés.

De plus, ces méthodes exposent à une grosse déperdition de l'antibiotique, très difficile à évaluer, soit au cours de la tyndallisation du milieu de Lœwenstein, soit au cours de l'évaporation si la Streptomycine est placée sur ce milieu après sa stérilisation.

Pour les cultures sur lames enfin, il semble que les bacilles contenus dans les crachats ou dans le liquide gastrique, fixés sur une lame, ne rentrent que difficilement en contact avec l'antibiotique.

Il apparaît donc que si la rapidité de ces méthodes est réelle, elles ne sont valables que pour des cas très particuliers, comme l'ont d'ailleurs précisé les auteurs qui les préconisent.

II. SUR L'ANIMAL

Gernez-Rieux, Sévin et M^lle^ Chauffet [16], ont voulu vérifier in vivo les résultats fournis par les tests pratiqués sur les milieux de culture. Pour cela ils utilisent la souris inoculée par voie péritonéale; certains animaux sont traités, d'autres servent de témoins; chez les animaux inoculés avec une souche sensible et traités, la rate est de volume normal au douzième jour alors qu'elle est considérablement augmentée de volume chez les témoins. Chez les animaux inoculés avec une souche résistante, la rate est hypertrophiée aussi bien chez les témoins que chez les animaux qui ont reçu l'antibiotique.

Ces auteurs font également un test intradermique chez le cobaye; les animaux témoins présentent rapidement une ulcération cutanée; les animaux traités ne présentent rien s'ils ont été inoculés avec une souche sensible, et font au contraire une ulcération identique à celle des témoins si l'inoculation a été pratiquée avec une souche résistante.

Ils pratiquent même deux inoculations à des sièges différents sur le même animal et l'on observe alors très nettement une inégalité entre les lésions produites par des souches n'étant pas de même sensibilité.

La méthode ingénieuse décrite par ces auteurs donne des résultats vraiment spectaculaires; malheureusement, elle est difficilement réalisable dans la pratique courante.

TESTS PRATIQUÉS A PARTIR D'UNE SOUCHE ISOLÉE PAR PRIMO-CULTURE

Ce sont les méthodes classiques; elles nécessitent la primo-culture, mais elles permettent par conséquent, de s'adresser indifféremment à des produits pathologiques riches en bacilles, ou pauci-bacillaires. Le prélèvement au fil de platine sur la culture initiale, permet la mise en suspension homogène des bacilles tuberculeux, indispensable à la précision du résultat. Cette suspension sera ensemencée sur des milieux contenant des concentrations variables de Streptomycine; habituellement on utilise un tube témoin sans antibiotique, et des tubes contenant 1, 10, 50 et 100 microgrammes de Streptomycine par centimètre cube de milieu. Les milieux les plus fréquemment utilisés sont les milieux liquides et, en particulier, le milieu de PROSKAUER et BECK, modifié par YOUMANS et KARLSON, et le milieu synthétique de DUBOS. Nous verrons par la suite et plus en détail, que les milieux solides donnent d'excellents résultats.

I. MILIEUX LIQUIDES

René Dubos, étudiant les facteurs de croissance du bacille tuberculeux [17 à 22], a préconisé des milieux synthétiques un peu différents les uns des autres, selon l'usage auquel on les destine. Parmi leurs applications se trouve l'étude de la sensibilité du bacille tuberculeux à la Streptomycine. Le milieu habituellement utilisé pour cela [23] a la composition suivante :

$PO^4 KH^2$	1 gm.
$PO^4 H Na^2$	6,3 gm.
Asparagine	2 gm.
Hydrolysat enzymatique de caséine	2 gm.
Citrate de Fer Ammoniacal	0,05 gm.
$SO^4 Mg^7 H^2O$	0,01 gm.
$Ca Cl^2$	0,0005 gm.
$So^4 Zn$	0,0001 gm.
$So^4 Cu$	0.0001 gm.
$H^2 O$	950 cc.
PH = 6,8.	
Tween 80	0,5 gm.

Autoclaver et ajouter de façon stérile :

Fraction V (sérum albumine)	5 gm. (sol. à 5 %)
Glucose	5 gm. (sol. à 50 %)

Ce milieu permet une croissance rapide du bacille tuberculeux et, par conséquent, une lecture précoce des résultats. Cependant, selon Williston et Youmans [24], la présence de Tween 80 augmente la sensibilité des bacilles tuberculeux à la Streptomycine. Youmans, d'ailleurs, préconise pour les tests, une modification du milieu de Proskauer et Beck, aboutissant à la composition suivante [25] :

Asparagine	0,5 gm.
$Po^4 KH^2$	0,5 gm.
$So^4 K^2$	0,05 gm.
Glycérine	2 cc.
H^2O	1.000 cc.
PH = 7.	
Citrate de Magnésium	0,15 gm.

Autoclaver et ajouter de façon stérile :

Plasma ou sérum humain ou bovin stérile, pour obtenir une concentration finale égale à 10 %.

Dans des mains expérimentées, ce milieu donne d'excellents résultats; parfois le citrate de magnésium ne se dissout pas parfaitement; parfois, comme avec beaucoup de milieux liquides et en particulier celui de DUBOS, les bacilles tuberculeux doivent être adaptés au milieu liquide non streptomyciné pendant plusieurs jours avant que le test puisse être pratiqué dans des conditions satisfaisantes. De grosses variations dans la quantité de bacilles ensemencée, modifient considérablement les résultats. De plus, ces milieux liquides ne permettent pas une appréciation suffisante de l'importance de la croissance dans les différents tubes, et par conséquent du nombre relatif des variants sensibles et résistants au sein de la souche étudiée.

Beaucoup de ces inconvénients peuvent être évités par l'emploi des milieux solides.

II. MILIEUX SOLIDES

On peut utiliser le milieu de Lœwenstein soit en y incorporant de la Streptomycine, mais celle-ci subit alors la tyndallisation, soit en mettant au contact sur le milieu une solution de Streptomycine et une émulsion bacillaire selon la technique de Froyez [26]. Cette dernière technique peut occasionner des déperditions de l'antibiotique, ou tout au moins sa sédimentation au fond du tube; de plus, on est obligé d'admettre à priori que l'ensemencement a été réalisé d'une façon homogène sur toute la surface du milieu, ce qui, techniquement, est difficile.

Avec Karlson et Needham [4 et 5], nous avons mis au point une technique sur gélose au jaune d'œuf qui nous paraît éviter beaucoup de ces inconvénients. A cet effet, la gélose est préparée de manière habituelle, utilisant la formule :

Extrait de bœuf.	3 gm.
Peptone.	10 gm.
Nacl.	8 gm.
Agar-agar.	10 gm.

Le tout dans un litre d'eau distillée stérile, contenant 10 cc. de glycérine (1).

On chauffe au bain-marie jusqu'à ce que le liquide soit parfaitement homogène; il est alors réparti dans des flacons de 200 cc. environ, à raison de 120 cc. par flacon. Les flacons sont alors stérilisés à l'autoclave et conservés à la glacière ou à la température du laboratoire.

Pour l'utilisation on prépare un œuf frais de poule pour chaque flacon; le jaune seul est incorporé aux 120 cc. de gélose, liquifiée au bain-marie et ramenée à une température de 56° environ. Le jaune est versé dans le milieu après que la coque de l'œuf ait été brisée à l'aide d'une pince stérile qui sert également à enlever le blanc de l'œuf et à en rendre le jaune homogène. Au préalable il est prudent de laver les œufs à l'eau savonneuse et de les faire séjourner 15 minutes dans de l'alcool à 70°.

(1) Le Dehydrated Nutrient Agar, préparé par Difco, Laboratories Detroit Michigan, donne toute satisfaction.

On ajoute alors la quantité de Streptomycine nécessaire pour obtenir les concentrations finales désirées; celles-ci doivent être calculées pour un volume de 135 cc., à savoir, 120 cc. de gélose, plus 15 cc. environ pour un jaune d'œuf. La dose totale de Streptomycine doit être contenue dans un centimètre cube de solution aqueuse; on agite, on se débarrasse de la mousse formée en versant le liquide dans un nouveau flacon stérile, on répartit en tube à raison de 5 cc. de milieu pour chaque tube; les tubes sont alors inclinés; dans les 12 heures suivantes, le milieu se durcit et est propre à l'utilisation. D'une manière habituelle nous employons un tube témoin et des tubes contenant du milieu streptomyciné dans les proportions précédemment indiquées (1, 10, 50 et 100 microgrammes par cc.).

L'ensemencement se fait à partir d'une suspension bacillaire contenant environ un milligramme par centimètre cube. Cette suspension est facile à obtenir : on prélève une, deux ou trois colonies sur la souche initiale; ces colonies sont broyées au mortier stérile dans une goutte d'eau distillée (PH 7), ou de bouillon ordinaire; on ajoute ensuite un à deux cc. de liquide choisi, de manière à obtenir un flou comparable à celui d'une culture de pneumocoques âgée de 24 heures. Chaque tube de milieu est ensemencé avec 0,10 cc. de la suspension; il est intéressant de noter que des variations relativement considérables dans la concentration de la suspension ne modifient pas les résultats; sur une série de tests nous avons pu vérifier ce fait en ensemençant la suspension originale, sa dilution au 1/10e et sa dilution au 1/50e.

Les tubes une fois ensemencés sont placés à l'étuve à 37° pendant 14 jours; on les laisse inclinés pendant 48 heures environ, verticaux ensuite. Au quatorzième jour, la lecture est pratiquée.

On peut exprimer les résultats soit en indiquant la sensibilité de la souche ou concentration minima de Streptomycine par centimètre cube de milieu, inhibant la croissance, soit en indiquant la résistance de la souche, ou concentration maxima de Streptomycine permettant cette croissance.

Des tests pratiqués sur 571 souches de bacilles tuberculeux

récemment isolées de malades jamais encore traités par la Streptomycine, nous ont montré que dans la plupart des cas ces souches étaient sensibles à un microgramme de Streptomycine par centimètre cube. La figure n° 1 nous montre le test pratiqué sur l'une de ces souches; celles qui étaient résistantes à la concentration de un microgramme se sont toujours montrées sensibles à dix.

Par contre, en étudiant des souches isolées de malades atteints de tuberculose pulmonaire ou rénale, traités par la Streptomycine, il nous est arrivé fréquemment d'isoler des souches résistant à 10, 50, 100, 1.000 microgrammes de Streptomycine, et même davantage. La figure n° 2 nous montre un test pratiqué sur l'une de ces souches.

Cette technique offre différents avantages :

1° La richesse du milieu permet une bonne croissance, même lorsqu'on s'adresse à une culture déjà âgée ou de faible volume;

2° Les variations dans la quantité des bacilles inoculés, ne modifient guère les résultats;

3° Le milieu solide permet d'apprécier approximativement le nombre relatif des bacilles sensibles et résistants au sein d'une même population bactérienne;

4° La Streptomycine n'étant exposée qu'à une température de 56°, conserve toute son activité;

5° La simplicité de la technique, et en particulier la simplicité de la préparation de la suspension bacillaire; le fait que le milieu préconisé peut être utilisé lorsqu'il n'est pas additionné de Streptomycine pour la primo-culture, font que ces techniques peuvent être réalisées dans un laboratoire ne possédant qu'un matériel réduit en ce qui concerne la bactériologie.

CARACTÈRES DES BACILLES RÉSISTANT A LA STREPTOMYCINE

Les caractéristiques de ces bacilles doivent être étudiées in vitro et sur l'animal.

In vitro tout d'abord. Nous n'avons pas remarqué de modifications ni dans la morphologie macroscopique des colonies, ni dans la morphologie microscopique des bacilles eux-mêmes.

Un point est intéressant à retenir, c'est que la résistance in vitro est élective; par exemple, une souche de bacilles tuberculeux primitivement sensible à la Streptomycine, devenue ensuite résistante à cet antibiotique, conserve à l'égard des sulfones et du P. A. S. une sensibilité inchangée, comme nous avons pu le vérifier bien des fois. Un problème s'est posé au moment de l'apparition de la dihydro-streptomycine; beaucoup d'auteurs s'étaient demandé si des bacilles tuberculeux résistant à la Streptomycine ne seraient pas sensibles à la nouvelle forme de cet antibiotique. Des tests réalisés par FELDMAN et ses collaborateurs soit in vitro, soit in vivo, ont montré de façon évidente qu'il n'en était rien.

Un caractère important des bacilles tuberculeux streptomycino-résistants est constitué par l'intensité du phénomène de résistance; en effet, c'est bien souvent que l'on rencontre des souches capables de pousser dans des milieux contenant 1.000 microgrammes de Streptomycine par centimètre cube, comme la souche de la figure n° 2. Cette intensité du phénomène d'une part, la toxicité de la Streptomycine, d'autre part, empêchent en clinique, de façon évidente, une augmentation des doses proportionnelle à l'adaptation de la souche.

La permanence de la résistance doit également être soulignée. Nous avons vu des souches de bacilles tuberculeux résistantes à la Streptomycine depuis plus de quatre ans, conserver ce caractère malgré de nombreux repiquages et plusieurs passages sur l'animal.

L'infection provoquée chez les animaux de laboratoires par des bacilles tuberculeux streptomycino-résistants, a été l'objet

de nombreuses expériences, dont les résultats sont particulièrement intéressants à étudier.

Nous avons eu l'occasion d'inoculer plusieurs groupes de cobayes avec des bacilles tuberculeux isolés du même malade avant et après une série de Streptomycine. Ce traitement avait considérablement modifié la sensibilité de la souche à l'antibiotique. Les animaux ne subissant aucun traitement, nous avons été frappés par le fait que ceux qui avaient reçu la souche encore sensible mouraient avant ceux qui avaient reçu une dose égale de la même souche devenue streptomycino-résistante. De plus, ces derniers présentaient à l'autopsie des lésions dures, criant sous les ciseaux, à caractère macroscopique fibreux. On peut donc se demander si les germes résistant à l'antibiotique ne sont pas légèrement moins virulents que ceux qui lui sont sensibles. Toutefois, il est important de noter que s'il y a diminution de virulence, elle n'est que minime, et que les animaux infectés avec des souches résistantes, présentent des lésions étendues qui entraînent la mort, ce qui contraste avec les faits observés parfois à propos de germes banaux pénicillino-résistants.

Les constatations faites par Feldman, Karlson et Hinshaw [27], dans l'expérience que nous rapportons ici, sont du plus haut intérêt.

Ces auteurs ont isolé chez un tuberculeux pulmonaire des bacilles résistant seulement à 0,31 microgrammes de Streptomycine par centimètre cube de milieu; le malade fut traité par l'antibiotique pendant quatre mois; à la fin du traitement, les germes isolés étaient résistants à 2.000 microgrammes par centimètre cube de milieu. Vingt-huit cobayes reçurent 0,10 mg de la première culture; vingt-huit autres, la même dose de la seconde culture. Au bout de 20 jours, quatre animaux de chaque groupe furent autopsiés pour apprécier les lésions présentes avant le début du traitement; ensuite, dans chaque groupe, 14 cobayes furent conservés comme témoins et 10 reçurent 6 mg de Streptomycine par 24 heures, à partir du vingtième jour. Au 166e jour de l'expérience, les cobayes survivants furent sacrifiés; parmi les animaux traités il y en avait 8 sur 10 inoculés avec la souche sensible, et seulement 2 sur

10 inoculés avec la souche résistante. Tous les témoins étaient morts.

La figure n° 3 nous montre le schéma des lésions macroscopiques observées à l'autopsie; comme on le voit, il existe une différence frappante entre les lésions des animaux témoins et des animaux traités inoculés avec une souche sensible, alors que cette différence est nulle en ce qui concerne les groupes inoculés avec les germes résistants.

Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par les examens histologiques, comme on peut le constater dans le schéma ci-dessous, qui résume, selon la technique de FELDMAN [28], les lésions tuberculeuses trouvées sous le microscope et cotées selon leur étendue et leur caractère évolutif.

SOUCHE	GROUPE	NOMBRE D'ANIMAUX	TOTAL DES LÉSIONS (maximum 100)
Sensible.	Témoins	14	95
	Traités	10	13,27
Résistante. . . .	Témoins	14	90,5
	Traités	9	91

La coupe de la figure n° 4 montre des lésions caséeuses observées dans le parenchyme pulmonaire d'un animal traité par la Streptomycine mais inoculé avec une souche résistante. Or, on sait que chez le cobaye inoculé avec une souche sensible et recevant l'antibiotique, on ne trouve que des lésions tuberculeuses minimes, à type cicatriciel, fibreux ou calcifié.

Ces résultats expérimentaux montrent que des animaux infectés avec des bacilles nettement résistants (2.000 microgrammes) présentent des lésions tuberculeuses extensives et mortelles, que l'animal reçoive ou non un traitement streptomyciné. YOUMANS et WYLLISTON [30] ont obtenu d'ailleurs des résultats comparables en utilisant la souris.

La question est cependant plus complexe car, bien souvent, une souche de bacilles tuberculeux présente une résistance

moins intense et comprend un mélange de germes sensibles et de germes résistants. On s'est donc demandé quelle était au sein d'une culture, la proportion de germes résistants au-dessus de laquelle cette culture créerait chez l'animal des lésions inaccessibles à la thérapeutique. On s'est également demandé quel était le taux de résistance au-dessus duquel une culture entraînerait les mêmes conséquences que celles rapportées dans l'expérience de Feldman.

Steenken et Wolinsky [29] pour répondre à ces questions, ont d'abord inoculé des animaux avec des mélanges contenant des quantités variables de bacilles tuberculeux streptomycino-sensibles et streptomycino-résistants. Ils ont également inoculé d'autres animaux avec des souches de différente résistance, ces expériences ont montré que chez le cobaye infecté la Streptomycine devient de plus en plus efficace dès que la proportion de bacilles résistants descend à 10 % et au-dessous par rapport au nombre de la population bactérienne totale. Si, au contraire, elle dépasse ces chiffres, les résultats sont à peu près égaux à ceux observés sur les animaux qui ont reçu 100 % de bacilles résistants. Par ailleurs, ces auteurs ont également montré que des cobayes inoculés avec des souches dont la résistance était supérieure à 15 microgrammes, ne répondaient plus à la thérapeutique alors que des animaux inoculés avec des souches dont la résistance est comprise entre 2,5 microgrammes et 15 microgrammes, répondent à la thérapeutique d'une façon seulement irrégulière.

Au cours des expériences faites sur l'animal avec des souches résistantes, on est dans certains cas frappé par le fait que les cobayes traités par l'antibiotique, meurent avant les animaux témoins. Par ailleurs, sur les tests in vitro de temps à autre on rencontre une souche de bacilles tuberculeux dont la croissance est plus importante sur milieu streptomyciné, que sur le milieu ne contenant pas d'antibiotique. Des faits de cet ordre ont été rapportés par Spendlove [66], Leanert [67], et Tison [68]. Toutefois, à notre connaissance, il s'est toujours agi de souches qui présentaient le caractère de dépendance vis-à-vis de la Streptomycine, d'une manière seulement temporaire. Rappelons que la dépendance caractérise l'état dans

lequel se trouve un germe vis-à-vis d'une substance devenue indispensable à son existence. Or, au bout de plusieurs repiquages la croissance des souches mentionnées par ces auteurs, se déroulait aussi bien sur milieu ordinaire que sur milieu streptomyciné. Ces souches inoculées aux animaux de laboratoire donnaient des lésions tuberculeuses aussi bien aux animaux traités par l'antibiotique, qu'à ceux qui servaient de témoins. S'il s'agissait de souches véritablement dépendantes, on devrait observer des lésions anatomiques uniquement sur les animaux traités, puisque ce sont les seuls qui reçoivent de la Streptomycine. Toutefois, il y a là un problème passionnant à étudier étant donné l'importance pratique qu'aurait sur le plan clinique l'apparition de souches streptomycino-dépendantes qui contre-indiqueraient formellement le traitement streptomyciné chez le sujet qui en est porteur. La mort anticipée des animaux traités par rapport à celle des témoins, peut s'expliquer peut-être par la toxicité du médicament, par la manipulation des animaux au moment de l'injection, par les conditions de l'expérience. Il est possible toutefois que certaines souches contiennent un petit nombre de variants streptomycino-dépendants; leur existence reste encore à être prouvée.

Les données expérimentales que nous venons d'exposer sont fort intéressantes; nous verrons plus loin quelles peuvent en être les incidences cliniques.

CIRCONSTANCES D'APPARITION DES BACILLES TUBERCULEUX STREPTOMYCINO-RÉSISTANTS

Nous envisagerons ces dernières :

1° In vitro;
2° Chez l'animal;
3° Chez les malades en traitement.

Dès leur premier rapport sur la question, YOUMANS et ses collaborateurs [2] mentionnent que plusieurs passages sur des milieux streptomycinés a concentrations croissantes, peuvent adapter des bacilles tuberculeux à l'antibiotique. Des observations analogues ont été faites aujourd'hui par de nombreux bactériologistes.

Sur l'animal, au contraire, on n'isole qu'exceptionnellement des bacilles streptomycino-résistants, à moins, bien entendu, que les animaux n'aient été inoculés avec une souche déjà résistante. A notre connaissance, FELDMAN, une seule fois, et STEENKEN une autre, ont trouvé des bacilles résistants à l'autopsie de cobayes inoculés avec une souche sensible et traités pendant longtemps par l'antibiotique. Ce phénomène ne s'est d'ailleurs jamais reproduit. L'apparition de bacilles streptomycino-résistants chez les animaux de laboratoire, est donc exceptionnelle et ceci pour des raisons qui ne sont pas précisées.

Chez le tuberculeux pulmonaire, traité par la Streptomycine, il est banal d'isoler, en cours ou en fin de traitement, des souches streptomycino-résistantes. Il semble que différents facteurs président à leur apparition; nous allons essayer d'en faire une étude analytique et critique.

Tout d'abord, le facteur « durée du traitement » semble très important. Nous voyons sur la figure n° 5 la courbe représentant le pourcentage de souches résistantes en fonction de la durée du traitement chez les malades qui en étaient porteurs,

telle qu'elle fut établie d'après les résultats de 2.100 tests rapportés au Council on Pharmacy and Chemistry des U. S. A. en 1948 [31].

Le facteur « durée du traitement » est très important mais il n'est pas tout. En effet, certains malades porteurs de souches sensibles à la fin de leur cure streptomycinée, deviennent les hôtes de souches résistantes dans les mois qui suivent l'interruption du traitement. Le laps de temps écoulé entre le début du traitement streptomyciné et la date à laquelle le test est pratiqué, a donc aussi une certaine importance; celle-ci est beaucoup plus grande que celle de la dose journalière qui ne semble pas jouer du tout comme le montre la courbe de la figure n° 6.

Les résultats qui ont servi à la construction de ces deux courbes sont fort intéressants; il faut se rappeler toutefois qu'ils ont été observés chez des malades chez qui on a pu isoler pendant longtemps des bacilles tuberculeux, c'est-à-dire chez des malades porteurs de formes de tuberculose qui sont précisément celles qui favorisent l'apparition des germes streptomycino-résistants, comme nous allons le voir maintenant. En effet, la chronicité ou l'évolutilité des lésions, l'organe atteint, la nature anatomique de la lésion elle-même, l'âge de cette dernière, sont autant de facteurs prépondérants.

Howard et ses collaborateurs [33] rapportent les statistiques suivantes : 84 % des malades atteints de tuberculose pulmonaire et présentant une excavation à la fin de leur traitement streptomyciné, sont porteurs de bacilles résistants, alors que ce phénomène ne s'observe que sur 4,9 % des malades atteints de tuberculose pulmonaire non excavée soumis à l'antibiotique.

Des résultats analogues sont rapportés par Mitchel [34] qui, de plus, mentionne que la collapsothérapie appliquée sur des lésions excavées, diminue les chances de streptomycino-résistance en cas de traitement par l'antibiotique. On peut se demander toutefois si la collapsothérapie n'a pas agi sur les malades observés par cet auteur, en diminuant le nombre des cultures positives recueillies, et par conséquent, en diminuant le nombre des sujets chez qui les tests de sensibilité pouvaient

être pratiqués, ce qui n'aurait certainement pas manqué de modifier les statistiques.

L'âge des lésions est aussi un facteur dominant; plus une lésion est jeune, proche de la primo-infection, moins la résistance a de chances d'apparaître, comme l'écrivaient récemment Etienne BERNARD [35], Pierre BOURGEOIS [36] et leurs collaborateurs.

Ces différents facteurs nous amènent à envisager le mécanisme qui préside à l'apparition des bacilles tuberculeux résistant à la streptomycine.

Problème très discuté qui ravive la querelle classique : l'adaptation est-elle progressive chez des individus exposés aux mêmes difficultés, comme le pensait LAMARCK, ou au contraire, correspond-elle à un processus de sélection naturelle entre individus adaptés spontanément et individus mal défendus, comme le pensait DARWIN ?

KLEIN et KIMMELMAN [38 et 39]. d'une part, ALEXANDER et LEIDY d'autre part [40 et 41], ont montré que pour certains germes, le mécanisme sélectif devait être retenu. Quelques faits paraissent décisifs à ces auteurs : existence de variants d'emblée résistants au sein de cultures sensibles, soudaineté d'apparition des variants résistants au sein de ces cultures, faibles écarts dans ces résultats avec de larges ensemencements, forts au contraire, avec des ensemencements restreints. Certains de ces faits établis à propos de bactéries intestinales, sensibles à la Streptomycine, ont été récemment mis en évidence pour le bacille tuberculeux comme nous allons le voir.

PYLE [42], cultivant en milieu streptomyciné solide les bacilles des crachats de malades atteints de tuberculose pulmonaire, a montré qu'avant même le début du traitement il existait quelques variants relativement résistants dont le nombre croissait aux dépens de celui des germes sensibles, au fur et à mesure que la thérapeutique était poursuivie. Ces faits ont été depuis confirmés par beaucoup d'autres auteurs et en particulier JENSEN [43] utilisant la méthode de culture sur lames, WOLINSKY [44] et ses collaborateurs, employant d'autres procédés.

Toutefois, ces variants isolés ne sont résistants qu'à des taux

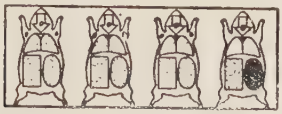
FIGURE N° 1. — Souche de bacilles tuberculeux sensible à un microgramme de Streptomycine. Photo prise après quatorze jours d'incubation. La lettre C indique le tube témoin. Les chiffres correspondent à la concentration de Streptomycine exprimée en microgrammes par centimètre cube de gélose au jaune d'œuf.

FIGURE N° 2. — Souche de bacilles tuberculeux résistante à mille microgrammes de Streptomycine. Photo prise après 14 jours d'incubation. La lettre C indique les tubes témoins. Les chiffres correspondent à la concentration de Streptomycine exprimée en microgrammes par centimètre cube de gélose au jaune d'œuf. Les tubes 1, 50 et 100 n'ont pas été utilisés dans ce test, car la souche était à notre connaissance streptomycino-résistante depuis fort longtemps.

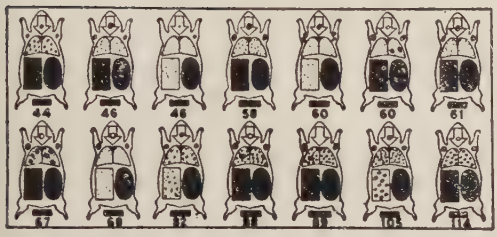
FIGURE N° 3.

Souche originelle.
Lésions 20 jours après
l'inoculation.

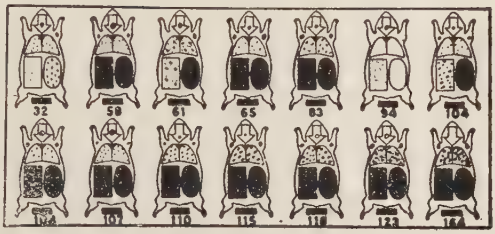
Souche résistante.
Lésions 20 jours après
l'inoculation.



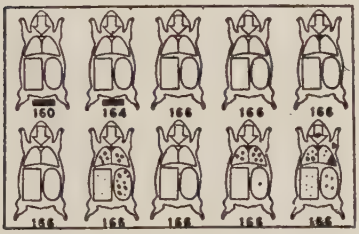
Témoins.



Témoins.

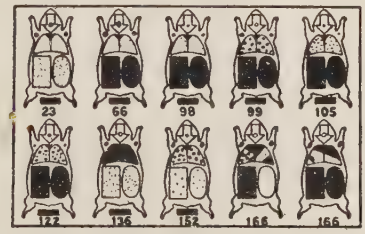


Traités à partir du 20e jour.



A

Traités à partir du 20e jour.



B

A : Représentation schématique des lésions trouvées chez 28 cobayes inoculés avec 0,1 mg. de bacilles tuberculeux isolés chez un malade avant tout traitement par la Streptomycine. Les petites barres noires indiquant que l'animal est mort avant la fin de l'expérience; le chiffre situé au-dessous représente le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et et la mort de l'animal. Noter l'extension des lésions avant le début du traitement (20e jour). Il existe une différence frappante entre les lésions des animaux témoins et celles des animaux traités par la Streptomycine.

B : Dans ce groupe les animaux ont reçu également 0,1 mg. de bacilles tuberculeux isolés du même malade soumis pendant plusieurs mois à la Streptomycinothérapie. Il existe des lésions tuberculeuses aussi étendues chez les animaux traités que chez les témoins.

D'après FELDMAN, KARLSON et HINSHAW, Streptomycin-Resistant Tubercle bacilli, *Amer. Review of Tuberculosis*, 57, fév. 1948.

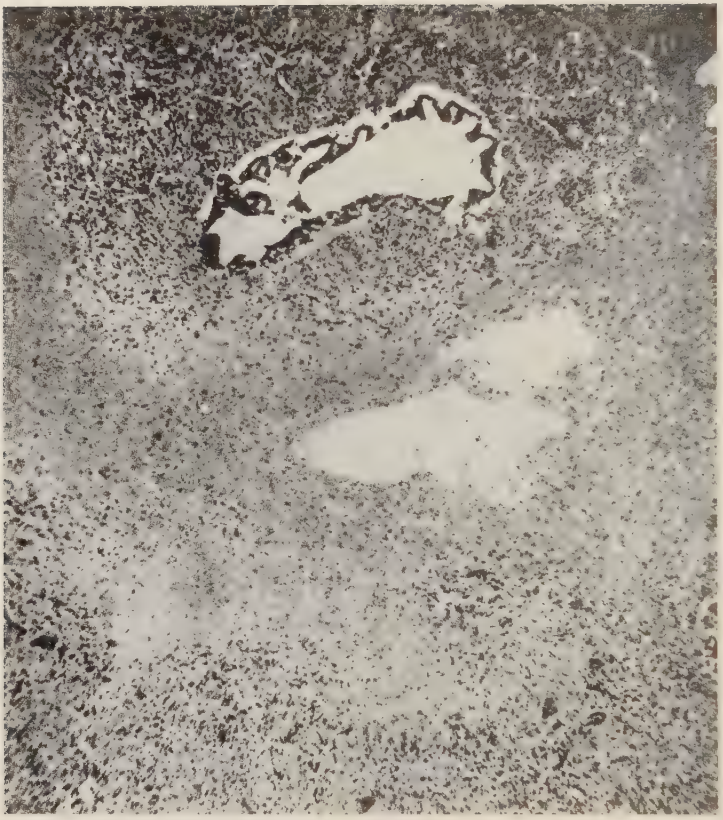


FIGURE N° 4. — Coupe de poumon d'un cobaye inoculé avec la souche streptomycino-résistante, mort après 102 jours de traitement. Les animaux inoculés avec une souche sensible et traités ne présentent habituellement que des lésions fibreuses ou calcifiées, parfois même il est difficile d'observer toute trace de tuberculose.

D'après FELDMAN, KARLSON et HINSHAW, Streptomycin-Resistant Tubercle bacilli, *Amer. Review of Tuberculosis*, 57, fév. 1948.

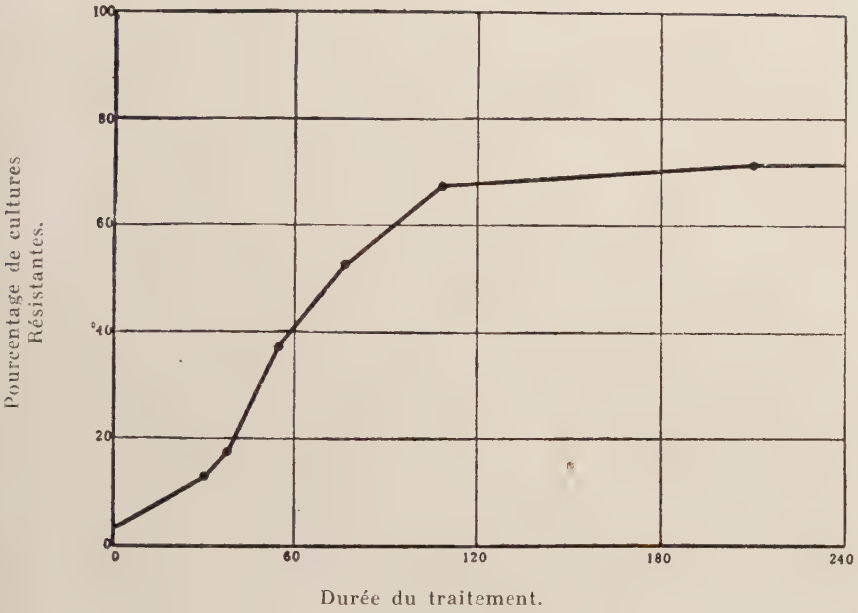


FIGURE N° 5. — Influence de la durée du traitement Streptomyciné sur l'apparition des souches streptomycino-résistantes.

D'après les résultats de 2.100 cultures rapportés au Council on Pharmacy and Chemistry, U. S. A., 1948.

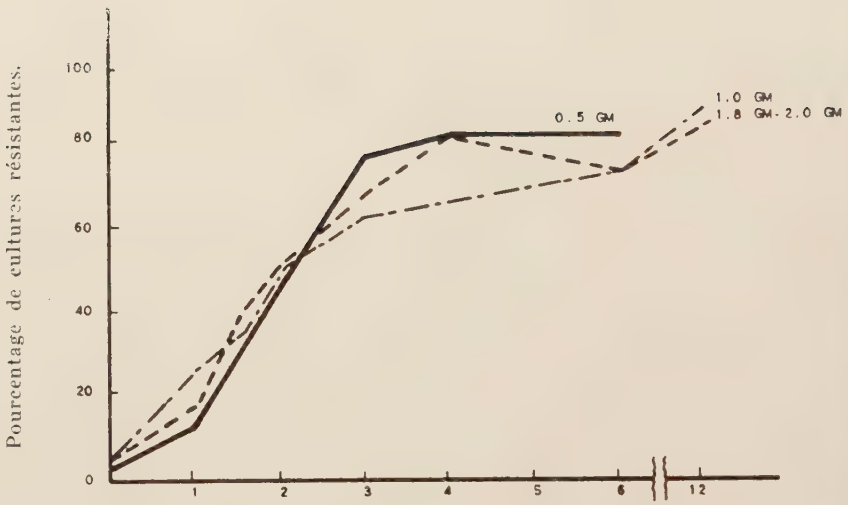


FIGURE N° 6. — Influence du temps écoulé entre le début du traitement et la date à laquelle les cultures sont pratiquées, sur l'apparition des souches streptomycino-résistantes. Les chiffres situés à l'extrémité des courbes indiquent la dose journalière.

D'après les Minutes of the Sixth Streptomycin conference of the veterans Administration, Octobre 1948.

relativement peu élevés de l'antibiotique (3,5 microgrammes habituellement), alors qu'en fin de traitement les souches ayant une résistance accrue de plusieurs centaines de fois, ne sont pas exceptionnelles. On peut donc se demander si on ne se trouve pas en présence d'un double mécanisme : 1° Sélection en faveur d'un petit nombre d'individus dont le caractère inné est le pouvoir d'adaptation; 2° Adaptation de ces individus à des taux d'antibiotique supérieurs à ceux dans lesquels ils étaient capables de se multiplier au début.

Ces données bactériologiques se superposent d'ailleurs facilement aux facteurs cliniques présidant à l'apparition de souches streptomycino-résistantes.

Les cavernes tuberculeuses hébergent habituellement un nombre considérable de bacilles, d'où grandes chances pour qu'il y ait des variants adaptables au sein de leur population; de plus, la faible concentration de Streptomycine obtenue au sein des cavités pulmonaires, comme l'a montré STEENKEN, facilite encore l'adaptation secondaire de ces variants à des taux progressifs de l'antibiotique, d'autant que celui-ci est partiellement inactivé par le caséum endocavitaire. Ces conditions sont d'ailleurs d'autant mieux remplies que la caverne est plus ancienne; or, nous avons vu déjà que ce sont les cavités les plus éloignées de la primo-infection qui étaient aussi les plus susceptibles d'entraîner l'apparition des bacilles tuberculeux streptomycino-résistants.

Les caractères bactériologiques des miliaires et des méningites trouvent aussi ici leur explication. Dans la tuberculose miliaire le parenchyme reste bien vascularisé; les bacilles que l'on peut mettre en évidence, sont relativement peu nombreux: on isole rarement des souches résistantes au cours d'une miliaire, même traitée pendant longtemps.

Les méninges sont aussi infectées par un petit nombre de bacilles; l'antibiotique y est apporté in situ en concentration suffisante; les échecs du traitement trouvent leur cause dans des cloisonnements [45] qui empêchent l'antibiotique d'atteindre le foyer infectieux; les rechutes sont dues bien souvent à la rupture d'un tubercule cérébral, c'est-à-dire d'une lésion siégeant dans un parenchyme où la Streptomycine ne pénètre

pas, ou bien se trouve inactivée; autant de facteurs qui expliquent la rareté des bacilles streptomycino-résistants [37] dans les espaces sous-arachnoïdiens.

Certains faits cliniques observés au cours du traitement des adénopathies tuberculeuses, paraissent trouver aussi leur explication dans les facteurs anatomiques. Le ganglion est peu vascularisé, sa capsule semble l'isoler en quelque sorte du reste de l'économie; beaucoup d'auteurs ont rapporté que les adénopathies étaient peu ou pas influencées par la Streptomycine et qu'elles devenaient souvent le réceptacle de bacilles résistants. Nous avons vu, par contre, dans le service de notre Maître, M. le Professeur Jean Tapie, des régressions spectaculaires de certaines adénopathies caséeuses, les malades étant soumis à l'antibiotique par voie générale, mais la Streptomycine étant aussi apportée directement dans le foyer par ponctions ganglionnaires.

Bien plus, la notion de variants résistants ou adaptables, a donné l'idée à certains auteurs, d'utiliser en tuberculose la chimiothérapie associée; ainsi les adaptables à la Streptomycine seraient atteints par le P. A. S. par exemple, et réciproquement.

In vitro tout d'abord, cette hypothèse s'est vérifiée et l'adaptation d'une souche à la Streptomycine, par plusieurs passages sur des milieux contenant des concentrations croissantes de l'antibiotique, est retardée par l'addition à ce milieu d'une sulfone ou de P. A. S.

Chez l'homme, le même phénomène a été rapporté par Karlson [46] et ses collaborateurs; ces auteurs ont étudié au cours du traitement, la sensibilité à la Streptomycine des germes isolés chez 14 malades atteints de tuberculose pulmonaire fibro-caséeuse ancienne; ces malades reçurent pendant six mois 0,50 gr. de Streptomycine et 10 gr. environ de P. A. S. par jour, associés deux semaines sur trois, à 5 gr. de Promine par 24 heures et par voie veineuse. Après 120 jours, un seul de ces malades était porteur de bacilles streptomycino-résistants. A la fin des six mois, trois autres malades étaient aussi porteurs de tels bacilles, mais deux d'entre eux, en raison de troubles digestifs, n'avaient pu poursuivre l'ingestion de P. A. S.

On voit donc que la proportion des malades porteurs de

bacilles résistants est très diminuée dans ce groupe en regard des chiffres observés avec les tuberculoses fibro-caséeuses anciennes traitées par la Streptomycine seule pendant un temps aussi long. Des résultats analogues ont été rapportés depuis par STEENKEN et TUCKER au Congrès de Bactériologie de Detroit, et par différents auteurs, comme en témoignent les Minutes de la Sixth Streptomycin Conference, dont nous avons déjà mentionné certains rapports.

Il semble donc que pour ces différentes raisons la clinique et la bactériologie arrivent à des conclusions de même ordre, et dont la superposition satisfait suffisamment l'esprit.

Cependant, bien des points restent obscurs; en particulier on ignore tout des modifications métaboliques subies par les bacilles tuberculeux streptomycino-résistants; on n'a pu jusqu'ici mettre en évidence aucune substance anti-streptomycine comparable à l'acide para-amino-benzoïque, ou anti-sulfamide ou encore comparable aux Penicillinases également appelés anti-pénicilline.

INCIDENCES CLINIQUES ET PARADOXES DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES TESTS DE SENSIBILITÉ A LA STREPTOMYCINE

Déjà entrevues par la grande majorité des cliniciens avant l'ère des tests de sensibilité, les conséquences de l'adaptation du bacille tuberculeux à l'antibiotique, s'imposent maintenant à leur décision thérapeutique quotidienne. Il est vraisemblable que lorsque chez un tuberculeux pulmonaire la Streptomycine n'apporte plus d'amélioration clinique et radiologique, celui-ci est porteur de souches composées en majorité de germes résistants.

Existe-t-il un rapport entre le degré étalonné de la résistance et les échecs thérapeutiques? Telle est la question qu'il nous faut envisager.

On admet généralement que les souches incapables de se développer dans un milieu contenant 10 microgrammes de Streptomycine par centimètre cube, sont sensibles à l'antibiotique et par conséquent, que les malades qui en sont porteurs, sont susceptibles d'être améliorés par son administration. Au contraire, il semble que les souches qui poussent dans un milieu contenant 50 microgrammes par centimètre cube soient résistantes et que leurs hôtes ne bénéficient pas de la mycothérapie. Très souvent d'ailleurs, les résultats sont encore beaucoup plus nettement tranchés et les bacilles sensibles sont inhibés par un microgramme de Streptomycine par centimètre cube, alors que les résistants se développent en présence de 100, 1.000 et même plus. Comme on en juge d'après ces chiffres, l'augmentation des doses sur le plan thérapeutique dans des proportions égales à celles de l'adaptation de la souche, est irréalisable contrairement à ce que l'on observe parfois avec des germes sensibles d'abord, adaptés ensuite à la Pénicilline.

Reste le problème des cas intermédiaires. La souche pousse dans un milieu contenant 10 microgrammes de Streptomycine et ne pousse pas en présence de 50 microgrammes; les avis sont alors partagés; nous avons vu que sur l'animal traité, les

résultats obtenus sont variables et inconstants lorsque ces animaux ont été infectés avec des souches dont la résistance est comprise entre 2,5 microgrammes et 15 microgrammes. Chez l'homme présentant des souches analogues, les résultats sont également très discordants d'un malade à l'autre; comment s'en étonner d'ailleurs, puisque la résistance du germe est voisine de la concentration sanguine maxima habituellement obtenue à la suite d'une injection de l'antibiotique.

Même pour les cas où l'on se trouve en présence de souches hautement streptomycino-résistantes, il existe sur le plan clinique des faits paradoxaux qui valent la peine d'être envisagés. A propos du mécanisme d'apparition des bacilles tuberculeux streptomycino-résistants, nous avons vu qu'une juxtaposition des facteurs anatomiques et des facteurs bactériologiques était fort intéressante; nous allons voir maintenant que cette juxtaposition aide à expliquer certains des faits discordants qui ont été observés.

Avant d'envisager des faits de cet ordre plus en détail, il est bon de rappeler le caractère parfois capricieux de la maladie tuberculeuse; antérieurement à la Streptomycine, on observait parfois des améliorations ou des poussées de l'affection difficilement explicables par les moyens thérapeutiques où les conditins de vie du malade. Il serait donc osé de penser qu'il existe dans 100 % des cas un parallélisme complet entre les données cliniques et les données biologiques; la tuberculose plus encore que beaucoup d'autres maladies est loin d'être soumise à des lois d'une rigueur comparable à celles qui régissent les sciences expérimentales.

On trouve parfois des malades porteurs de souches résistantes avant tout traitement. Ces observations sont encore rares; elles semblent dues à une contamination à partir d'un porteur de germes adaptés.

D'autres malades chez qui l'on isole des bacilles résistants in vitro, continuent à être améliorés par le traitement; Gernez-Rieux [47] et ses collaborateurs, en ont récemment rapporté quelques observations. De tels exemples ne sont pas en contradiction avec les données bactériologiques telles que nous les avons relatées, qui nous montrent par les méthodes sur milieux

solides, l'existence de bacilles sensibles et de bacilles résistants au sein d'une même population bactérienne.

Chacun sait que bien souvent une caverne pulmonaire est entourée d'une zone périfocale; la caverne elle-même mal vascularisée, plus ou moins remplie de caséum, devient le réceptacle de germes résistants, alors que la lésion périfocale, par sa bonne vascularisation, conserve la sensibilité de ses germes; résultat: l'aspect radiologique s'améliore et, cependant, l'expectoration du malade contient des bacilles streptomycino-résistants.

Comme Coletsos l'a récemment souligné dans des faits de cet ordre [48], les facteurs anatomiques semblent être aussi importants que les facteurs bactériologiques; bien plus, les premiers semblent parfois conditionner les seconds.

Par ailleurs, certains malades, malgré la forme fibro-caséeuse ancienne de leur tuberculose pulmonaire, malgré la longue durée de leur traitement streptomyciné, semblent ne jamais pouvoir devenir porteurs de souches streptomycino-résistantes comme en témoignent les graphiques que nous avons déjà présentés. Ne serait-ce pas parce que la lésion est tellement fibreuse, tellement fermée à un apport sanguin, que la Streptomycine n'y pénètre pas et que l'adaptation secondaire des variants primitivement « adaptables » qui pourraient éventuellement s'y trouver, ne peut donc pas se produire ?

Les facteurs anatomiques expliquent aussi la dissociation bien connue des résultats observés sur deux localisations différentes chez le même malade soumis à la mycothérapie. On sait que certaines lésions s'améliorent alors que d'autres empirent ou restent stationnaires. Ces facteurs peuvent expliquer également les différences de sensibilité des souches isolées sur deux foyers différents chez le même sujet, comme l'ont rapporté Bariéty [49] pour un malade atteint de tuberculose pulmonaire et méningée et Etienne Bernard [50] à propos d'un malade porteur de miliaire et d'adénopathie cervicale.

Nous ne reviendrons pas sur les faits discordants observés en clinique au cours du traitement par la Streptomycine des adénopathies tuberculeuses, les ayant déjà envisagés au cours

de l'étude du mécanisme d'apparition des souches streptomycino-résistantes.

Un autre fait paradoxal au premier abord est l'apparition d'une souche sensible chez un malade ayant présenté auparavant une souche résistante. On sait, en effet, que la résistance à la Streptomycine du bacille tuberculeux est un caractère permanent comme nous l'avons déjà mentionné. C'est là que l'on touche à l'imperfection de nos méthodes bactériologiques courantes.

En effet, le test bactériologique ne part que d'une fraction infime par rapport à la population bactérienne totale; une fois il peut s'adresser à une fraction résistante de cette population, la fois suivante, à une fraction sensible, même si celle-ci n'en constitue qu'une petite part. Le test idéal devrait étudier chaque colonie séparément; malheureusement, cela est pratiquement irréalisable dans un laboratoire appelé à faire des examens en série sur un grand nombre de malades.

Heureusement des faits paradoxaux comme ceux que nous venons de signaler restent l'exception et, dans la grande majorité des cas, les règles exposées au début de ce chapitre sont valables et les résultats fournis aux cliniciens par les tests de sensibilité constituent un précieux apport pour la conduite du traitement antibiotique de la maladie; d'autant que les méthodes sur milieux solides telles que nous les avons précédemment décrites, évitent beaucoup de causes d'erreur comme nous avons eu l'occasion de le préciser. Nous nous proposons d'ailleurs dans un travail ultérieur, avec un recul d'observation suffisant, de rapporter les résultats comparatifs entre les données biologiques et l'évolution clinique portant sur d'importantes statiques déjà publiées [51] auxquelles viendront s'ajouter les chiffres concernant des faits plus récents. Nous ne doutons pas de trouver là encore une confirmation des opinions que nous avons soutenues.

BACILLES TUBERCULEUX RESISTANT AU P. A. S.

Depuis les travaux de LEHMAN [52], en 1946, l'action antituberculeuse du P. A. S. a été très étudiée. Les effets bactériostatiques in vitro de cette médication ont été observés par YOUMANS [53] ; son action favorable sur la tuberculose expérimentale du cobaye a été démontrée par FELDMAN [54 et 55] et ses collaborateurs. Les premiers résultats cliniques ont été rapportés par VALLENTIN [56] et CARSTENSEN [57].

Instruits cependant par l'expérience de la Streptomycine en tuberculose, beaucoup de cliniciens et de bactériologistes ont recherché dès l'emploi du P. A. S. la présence de bacilles tubercueux adaptés à cette médication. Fait assez curieux, pendant un laps de temps relativement long, jamais on ne réussit à isoler de tels germes. En 1947, dans une conférence prononcée à l'Institut Pasteur, LEHMAN annonçait qu'il avait échoué en essayant d'adapter in vitro des bacilles tuberculeux a des concentrations élevées de P. A. S.

HURNI [58] reprit plus tard le même problème et réussit, après huit passages sur milieux contenant du P. A. S., a faire pousser des bacilles tuberculeux dans des concentrations supérieures à celles qui inhibaient toute croissance de la souche au début de l'expérience.

Par ailleurs, EASTELAKE et BARACH [59], mentionnent que les souches de bacilles tuberculeux isolés chez trois malades ayant reçu 210, 630 et 1.000 grammes de P. A. S., poussaient dans des concentrations de la médication très supérieures à celles qui inhibaient la croissance des souches isolées de malades qui n'avaient jamais été traités.

WIDSTROM et SWEDBERG [60 et 61], constatent des différences considérables dans la sensibilité au médicament de certaines

souches humaines et bovines; ils constatent, en outre, que certains de leurs malades présentent, en fin de traitement, des souches de résistance accrue à l'égard du médicament. SWEANY [62] et ODELBERG [63], font la même constatation.

Toutefois, la plupart de ces auteurs mentionnent que ces phénomènes sont relatifs; que la croissance dans des milieux contenant des concentrations élevées de P. A. S. est irrégulière, peu marquée, certains même disent qu'il ne s'agit pas de résistance vraie.

Avec KARLSON et ses collaborateurs, nous avons, dans une série de travaux [3, 64 et 65], apporté une certaine contribution au problème de la résistance du bacille tuberculeux au P. A. S., nous en rappellerons ici les grandes lignes techniques et les principaux résultats.

I. TECHNIQUE DE MISE EN ÉVIDENCE

La méthode employée est semblable à celle que nous avons décrite pour les tests de sensibilité à la Streptomycine.

Le milieu de base est le même, milieu de HERROLDS ou gélose additionnée de jaune d'œuf. Ce milieu reçoit des quantités convenables de para-amino-salicylate de soude en solution aqueuse; nous utilisons le sel de sodium, le P. A. S. lui-même étant difficilement soluble dans l'eau. Les solutions aqueuses ainsi obtenues sont stérilisées par filtration en raison de l'instabilité du produit à haute température. Les dilutions employées sont calculées en vue d'obtenir des concentrations finales variant de 0,006 mg. à 6,4 mg. et plus, par 100 cc. de milieu.

Les ensemencements sont faits à partir de colonies isolées par primo-culture, mises en suspension dans de l'eau distillée ou du bouillon ordinaire, après broyage au mortier stérile. 0,10 centimètre cube d'une suspension contenant environ 1 mg. de bacilles par centimètre cube, sert à ensemencer chaque tube. Après cette opération, les tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant 14 jours, les résultats sont alors lus et vérifiés au vingt-huitième jour.

Résultats :

Nous avons étudié la sensibilité au P. A. S. de 107 souches de bacilles tuberculeux humains, toutes se sont montrées extrêmement sensibles à de très faibles concentrations de para-amino-salicylate de soude; 95 % de ces souches étaient incapables de se développer dans des concentrations aussi basses que 0,012 mg. du produit par 100 cc. de milieu; c'est dire qu'en ce qui concerne les concentrations utiles in vitro, le P. A. S. est beaucoup plus bactériostatique que la Streptomycine. Parmi ces souches, 15 étaient résistantes à la Streptomycine, sans que leur sensibilité au P. A. S. ait été modifiée. Un petit nombre de souches humaines, 5 % environ, étaient seulement inhibées par 0,025; une seule était résistante à 0,05 mg. par 100 cc. de milieu. Les bacilles tuberculeux ainsi étudiés provenaient bien entendu de malades qui n'avaient jamais été exposés à la médication.

Deux souches bovines examinées se montrèrent légèrement plus résistantes que les humaines.

Douze souches de bacilles tuberculeux aviaires poussaient par contre très facilement dans un milieu contenant 3,4 mg. de Na P .A. S. par 100 cc. Elles ont donc une résistance plusieurs centaines de fois égale à celles des souches humaines habituellement rencontrées. Ce fait n'est pas très surprenant; on se rappelle que le P. A. S. avait été conçu par LEHMAN à la suite d'une discordance entre les modifications observées sur la respiration des bacilles tuberculeux virulents et non pathogènes, mis en présence de salicylate. Cette discordance avait amené l'auteur à penser que la virulence du bacille tuberculeux était liée à un mécanisme dans lequel les salicylates jouaient un rôle important; il croyait donc qu'une substance voisine, le P. A. S. en l'espèce, bloquant les salicylates pourrait agir sur les bacilles tuberculeux virulents. Cet espoir se réalisa, mais le P. A. S. étant aussi bactériostatique pour certaines souches avirulentes comme le B. C. G., il semble que son action soit due à un mécanisme différent de celui qu'avait prévu LEHMAN. Le fait que les bacilles aviaires, rarement pathogènes pour l'homme, ne soient pas influencés par cette médication s'inscrit au contraire en faveur des hypothèses faites par l'auteur suédois.

De toute façon, la figure n° 7 nous montre un test pratiqué sur une souche de bacilles tuberculeux humains isolés d'un malade n'ayant jamais reçu la médication. On voit que la sensibilité de cette souche rentre dans les chiffres que nous avons mentionnés plus haut, comme étant celle de la très grosse majorité des bacilles tuberculeux humains. Par contre, la figure n° 8 nous montre un test pratiqué sur une culture isolée chez un malade traité pendant longtemps par du P. A. S. seul; on voit que certains bacilles de cette souche sont capables de pousser dans des concentrations plusieurs centaines de fois supérieures à celles qui inhibent habituellement la croissance. La différence entre l'intensité de la croissance observée dans le tube contenant 6,4 mg. par 100 cc., et les tubes ayant des concentrations beaucoup plus basses, suggère qu'au sein de la souche étudiée, se trouvent à la fois des bacilles sensibles au P. A. S. et des bacilles résistant à cette médication. Au cours

d'un repiquage, les bacilles prélevés dans le tube contenant 6,4, se sont montrés capables de pousser dans des concentrations encore beaucoup plus élevées de para-amino-salicylate de soude.

Il n'est donc pas douteux que l'on se trouve en présence de bacilles tuberculeux humains devenus résistants in vitro à la médication.

II. CARACTÈRES DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT AU P. A. S.

Comme chez les bacilles streptomycino-résistants, nous n'avons pu mettre en évidence aucune modification morphologique des colonies ou des bacilles eux-mêmes, lorsque ceux-ci étaient résistants au P. A. S.

Les lésions que nous avons observées chez le cobaye ou chez la souris infectés avec des bacilles résistants, ont les caractères observés chez des animaux infectés avec des bacilles d'une sensibilité normale. C'est donc dire que la résistance du bacille tuberculeux à la médication, ne semble pas diminuer, de façon considérable tout au moins, sa virulence.

Il est encore trop tôt pour dire si les souches devenues résistantes garderont ce caractère de façon définitive. Toutefois, plusieurs passages in vitro et un passage sur l'animal ne l'ont pas jusqu'ici modifié.

Il était particulièrement intéressant de savoir si les animaux infectés avec des bacilles tuberculeux résistant in vitro au para-amino-salicylate de soude allaient voir leurs lésions tuberculeuses améliorées au cours d'un traitement par le P. A. S. C'est ce qui nous a amenés à pratiquer l'expérience que nous rapportons ici.

Un premier groupe de 12 cobayes, pesant environ 500 gr., a été inoculé par voie sous-cutanée avec 0,2 mg. d'une culture de bacilles tuberculeux sensibles in vitro à 0,024 mg. de Na P. A. S. par 100 cc. Cette culture avait été isolée chez un malade avant que celui-ci reçut la médication.

Un second groupe de 12 cobayes de poids sensiblement égal, fut inoculé avec 0,2 mg. également d'une culture de bacilles tuberculeux résistant in vitro à plus de 3,2 mg. de Na P. A. S. par 100 cc. de milieu. Cette culture avait été isolée du même malade après 157 jours de traitement, avec 10 gr. de P. A. S. par jour.

Le jour suivant l'inoculation, la moitié des animaux dans chaque groupe reçut une alimentation contenant 4 % de P. A. S.; l'autre moitié des animaux reçut une alimentation

normale, et servit de témoin. L'expérience fut arrêtée le 62e jour de l'infection, les lésions macroscopiques trouvées à l'autopsie furent notées sur le schéma que nous reproduisons sur la figure n° 9; de plus, les examens histologiques des poumons, du foie, de la rate, des ganglions lymphatiques et du siège d'inoculation, furent pratiqués.

Résultats :

Nous voyons de façon évidente que les organes des animaux témoins présentaient des lésions tuberculeuses étendues, que l'inoculation ait été pratiquée avec des germes sensibles ou résistants.

La comparaison entre les lésions trouvées chez les animaux traités est très intéressante. Comme on peut le voir, toujours sur le schéma de la figure n° 9, les animaux inoculés avec une souche sensible ne présentent que des lésions minimes, très différentes de celles des témoins; les animaux inoculés au contraire avec une souche résistante présentent des lésions tuberculeuses d'une extension à peu près égale à celle des témoins.

Ces constatations macroscopiques furent confirmées d'ailleurs par des constatations microscopiques, faites selon la technique de FELDMAN et côtées numériquement selon la méthode décrite par le même auteur. Les résultats globaux de ces examens histologiques sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

SOUCHE	GROUPE	NOMBRE D'ANIMAUX	TOTAL DES LÉSIONS (maximum 100)
Sensible.	Traités	6	29,2
	Témoins	6	85,6
Résistante. . . .	Traités	5	85
	Témoins	6	80,8

On voit que du point de vue histologique il existait des lésions extensives chez les animaux appartenant aux deux

groupes témoins. Sous le microscope il était impossible de distinguer les lésions produites par la souche sensible et la souche résistante.

Les animaux infectés avec la souche résistante et traités par le P. A. S. présentaient également des lésions du même ordre. Par contre, les animaux traités de la même façon mais infectés avec la souche sensible, étaient porteurs de lésions à caractère régressif, fibreuses ou calcifiées, et très peu étendues. Les deux coupes de la figure n° 10 donnent une idée du résultat de ces examens histologiques.

Les souches isolées par prélèvement splénique chez les animaux avaient conservé leur caractère initial de sensibilité ou de résistance.

Il ressort donc de cette expérience que les souches résistantes au P. A. S. in vitro le sont également chez le cobaye.

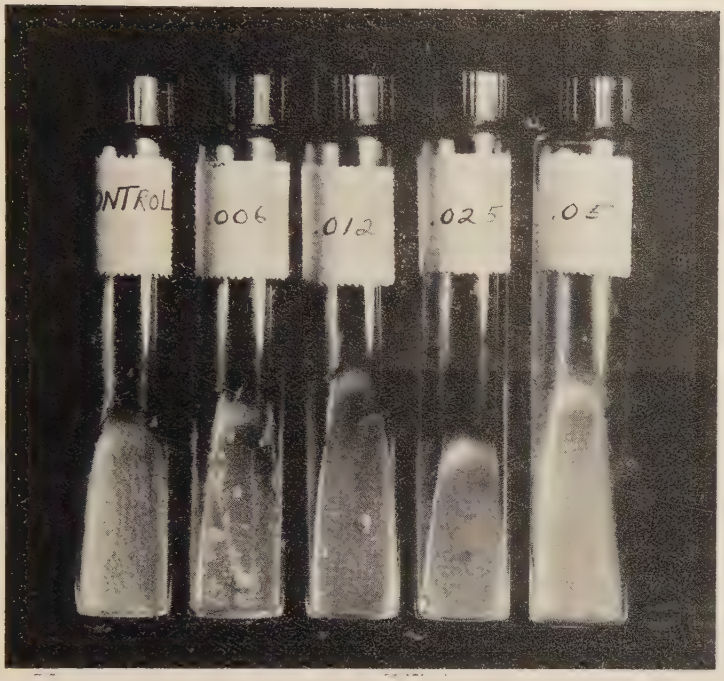


FIGURE N° 7. — Souche de bacilles tuberculeux sensibles à 0,025 mg. de Na P.A.S. par 100 cc. de milieu. Photo prise après 14 jours d'incubation. Le tube de gauche est le tube témoin, les chiffres indiquent la concentration de Na P.A.S. exprimée en milligrammes par 100 cc. de gélose au jaune d'œuf.

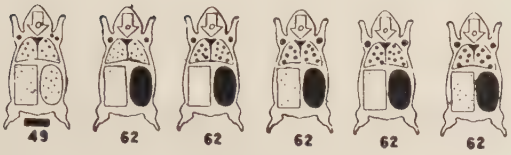
D'après DELAUDE, KARLSON, CARR, FELDMAN, PFUETZE, Proc. Staff Meeting Mayo Clinic, 24-341-348, Juin 1949.

FIGURE N° 8. — Souche de bacilles tuberculeux résistante à plus de 3,2 mg. de Na P.A.S. par 100 cc. de milieu. Photo prise après 14 jours d'incubation, le tube de gauche est le tube témoin. Les chiffres indiquent la concentration de Na P.A.S. exprimée en milligrammes par 100 cc. de gélose au jaune d'œuf.

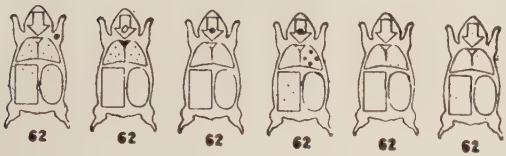
D'après DELAUDE, KARLSON, CARR, FELDMAN, PFUETZE, Proc. Staff Meeting Mayo Clinic, 24-341-348, Juin 1949.

Souche sensible au P. A. S.

Témoins.



Traités.



Souche résistante au P. A. S.

Témoins.

Traités.

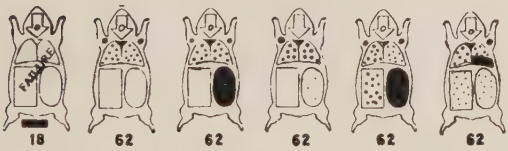


FIGURE N° 9. — Représentation schématique des lésions tuberculeuses trouvées à l'autopsie. Les petites barres noires indiquent la mort de l'animal; les petits chiffres situés au-dessous indiquent le nombre de jours écoulés entre celle-ci et l'inoculation. Un cobaye marqué « failure » est mort prématurément d'une infection intercurrente et a été exclu de l'expérience.

D'après KARLSON, DELAUDE, FELDMAN et CARR, Proc. of the Staff Meeting Mayo Clinic, 24-544, Octobre 1949.

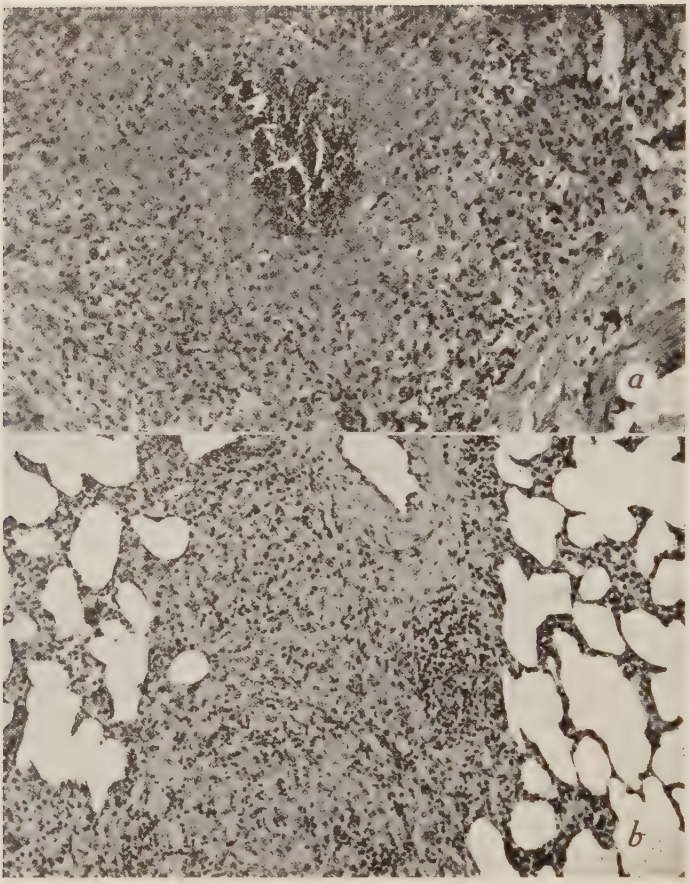


FIGURE N° 10. — *a*) Lésions extensives et nécrotiques au niveau du poumon d'un cobaye traité par le P.A.S. et infecté avec une souche résistante.

b) Lésions régressives et fibreuses au niveau du poumon d'un cobaye traité par le P.A.S. mais infecté avec une souche sensible.

D'après KARLSON, DELAUDE, FELDMAN et CARR, Proc. of the Staff Meeting Mayo Clinic, 24-544, Octobre 1949.

III. CIRCONSTANCES D'APPARITION DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT AU P. A. S.

Nous avons déjà mentionné les travaux de HURNI qui réussit à augmenter partiellement la résistance de souches de bacilles tuberculeux par plusieurs passages sur des milieux contenant des concentrations croissantes de P. A. S.

Nous avons également observé le phénomène avec des souches récemment isolées chez des tuberculeux pulmonaires.

Selon notre expérience, la sensibilité ou la résistance des souches qui avaient servi à infecter les cobayes ou les souris, s'est toujours montrée inchangée à l'autopsie, même si les animaux avaient été traités. Il y a là un phénomène analogue à celui observé avec la Streptomycine; il semble donc que le cobaye ne soit pas un hôte favorable à l'apparition de souches résistantes.

Chez l'homme, nous avons pu mettre en évidence des bacilles tuberculeux résistant au P. A. S. chez quatre malades traités respectivement pendant 267, 131, 183 et 185 jours et ayant reçu des doses totales de 2.250, 391, 1.650 et 1.850 gr. de la médication. La sensibilité des souches de ces malades était normale avant que le traitement soit entrepris.

Ces résultats ne portant pour l'instant que sur un nombre peu considérable de sujets, montrent cependant que des souches résistantes au P. A. S. peuvent être isolées chez les malades en traitement par cette médication et porteurs auparavant de souches sensibles.

IV. INCIDENCES CLINIQUES DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES TESTS DE SENSIBILITÉ AU P. A. S.

En raison du peu de recul actuel, ces tests ne sont pas encore passés dans la pratique courante; leur interprétation est donc difficile sur le plan clinique. Celle-ci ne pourra être faite que par la comparaison des données fournies par le laboratoire et des résultats cliniques observés au cours des traitements par la médication.

Pour l'instant, il nous semble que la P. A. S.-résistance soit moins importante que la streptomycino-résistance; elle semble plus rare; elle est moins intense, c'est-à-dire qu'il y a moins de différence entre les souches sensibles et les souches résistantes; elle met beaucoup plus longtemps à s'établir, comme le font penser les délais nécessaires à son apparition chez les quatre malades mentionnés plus haut. D'autre part, un nombre plus considérable de malades traités pendant 90 jours seulement ne se sont jamais révélés porteurs de bacilles P. A. S.-résistants.

La comparaison des résultats cliniques et des données biologiques déjà difficiles à propos de la Streptomycine, risque de se montrer encore plus délicate pour le P. A. S. étant donné la lenteur de l'action de ce médicament chez les tuberculeux.

BACILLES RESISTANT SIMULTANEMENT A LA STREPTOMYCINE ET AU P. A. S.

Chez deux malades traités dans un premier temps par une cure de Streptomycine, on avait pu mettre en évidence dans les crachats des bacilles tuberculeux résistant à l'antibiotique. Un traitement par le P. A. S. fut alors entrepris; à la fin de ce traitement, les souches isolées se montrèrent résistantes aux deux médicaments. Il est intéressant de noter que ces souches sont passées par trois stades :

1° Sensibilité à la Streptomycine et au P. A. S.;

2° Résistance à la Streptomycine et sensibilité au P. A. S.;

3° Résistance aux deux médicaments.

La figure n° 11, montre l'une de ces souches à son stade terminal; on voit qu'elle est capable de pousser dans un milieu contenant 1.000 γ de Streptomycine par centimètre cube et 3,2 mg. de Na P. A. S. par 100 cc. Ce sont là des concentrations de l'une et de l'autre médication plusieurs centaines de fois égales à celles capables d'inhiber habituellement et pour leur propre compte, la croissance des bacilles tuberculeux humains et en particuier celle des bacilles isolés chez nos deux malades avant toute thérapeutique antibiotique ou chimiothérapique.

On était en droit de se demander si l'inactivation réciproque des deux médicaments n'était pas à la base d'un tel résultat

in vitro; en réalité, des tests pratiqués avec des souches streptomycino-résistantes seulement et avec des souches P. A. S.-résistantes seulement, ont montré qu'il n'en était rien. Il est intéressant de noter que les bacilles de ces deux malades avaient conservé in vitro une sensibilité normale à l'égard des sulfones.

Il n'est donc pas douteux que des bacilles tuberculeux résistant simultanément à deux médications, peuvent apparaître chez des malades, à condition que ceux-ci aient été traités par ces deux médications administrées séparément et à des périodes différentes.

Nous avons vu, par contre, que l'administration simultanée de P. A. S. et de Streptomycine était susceptible de diminuer des chances d'apparition de souches streptomycino-résistantes; les résultats que nous avons obtenus avec KARLSON [3] suggèrent que l'administration simultanée des deux médicaments, présente également l'avantage de diminuer les chances d'apparition des souches P. A. S.-résistantes. Sur un groupe de 8 malades ayant reçu des doses sensiblement égales de P. A. S., 4 absorbaient seulement cette médication, alors que les quatre autres recevaient en même temps un traitement streptomyciné.

Sur les 4 premiers malades, 3 devinrent porteurs de souches P. A. S.-résistantes, alors qu'aucun des quatre autres ne présenta ce phénomène.

Il y a là un fait particulièrement intéressant pour l'avenir de la thérapeutique anti-bactérienne appliquée à la tuberculose; parallèlement aux observations expérimentales de KLEIN et KIMMELMAN, ce phénomène invite à l'emploi de la chimiothérapie combinée ou de la thérapeutique simultanée par plusieurs antibiotiques, alors même que l'on s'adresse à des germes non tuberculeux mais susceptibles de développer une résistance acquise.

FIGURE N° 11. — Souche de bacilles tuberculeux résistante simultanément à 1 000 microgrammes de Streptomycine par centimètre cube de milieu et à 3,2 mg. de Na P.A.S. par 100 cc. de milieu. Le tube de gauche ne contient pas de médicament. Le nombre 1 000 indique la concentration de Streptomycine exprimée en microgrammes par centimètre cube de gélose au jaune d'œuf. Les autres chiffres indiquent la concentration de Na P.A.S. exprimée en milligrammes par 100 cc. de gélose au jaune d'œuf. Photo prise après 14 jours d'incubation.

D'après KARLSON, DELAUDE et NEEDHAM, *Annales de l'Institut Pasteur*, janvier 1950.

CONCLUSIONS

La présence de bacilles tuberculeux résistant à la Streptomycine chez certains des malades en traitement par l'antibiotique, est un phénomène indéniable.

L'apparition de ces bacilles peut ne jamais se produire, se montrer tardive, ou au contraire, précoce, par rapport au début du traitement.

Si ce phénomène n'explique pas tous les échecs de la médication, il est responsable de beaucoup d'entre eux. De plus, en raison de la permanence du caractère de l'adaptation, il constitue un danger considérable non seulement pour le sujet porteur de bacilles tuberculeux streptomycino-résistants, mais également pour la communauté, en raison des possibilités de contagion.

Nous avons démontré qu'il existe également des bacilles tuberculeux résistant au P. A. S.; l'avenir seul nous dira quelle est du point de vue pratique leur importance.

L'existence de bacilles résistant simultanément à la Streptomycine et au P. A. S. a également été démontrée par nos soins chez des malades soumis à ces deux médications, administrées isolément et à des périodes différentes. Par contre, l'administration simultanée des deux médicaments, semble pouvoir retarder ou éviter non seulement l'apparition de bacilles résistant à la Streptomycine, mais également celle de bacilles résistant au P. A. S.

Pour toutes ces raisons il nous semble indispensable qu'aujourd'hui les centres importants de Phtisiologie soient équipés d'un laboratoire pouvant rechercher la résistance des bacilles tuberculeux aux médicaments que nous utilisons. Les résultats fournis par de tels laboratoires devraient permettre :

[12] Pryce, Sputum film cultures of Tubercle bacilli. — A method for the early observation of growth, *Journ. of Path. and Bact.*, 53-327, 1941.

[13] Muller. — On the use of a modification of Pryce's slide culture method for the estimation of the bacteriostatic power of chemicals on the tubercle bacilli, *Journ. of Path. and Bact.*, 56-429, 1944.

[14] Etienne Bernard et Kreis. — La méthode de culture sur lames du bacille de Koch. Son intérêt pour la recherche de la streptomycino-résistance, *Rev. de la Tuberculose*, 13-124, 1949.

[15] Etienne Bernard et Kreis. — La sensibilité à la Streptomycine du bacille tuberculeux étudiée par la microculture sur lames dans le sang des malades en traitement, *Rev. de la Tuberculose*, 13-737, 1949.

[16] Gernez-Rieux, Sevin, Mlle Chauffet. — Etude comparative des procédés de recherche de la streptomycino-résistance du bacille tuberculeux *in vitro* et *in vivo*, *Rev. de la Tuberculose*, 13-326, 1949.

[17] Dubos. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 58-351, 1945.

[18] Dubos. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 63-56, 1946.

[19] Dubos. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 85-9, 1947.

[20] Dubos, Davis, Middlebrock, Pierce. — *Amer. Revue Tuberculosis*, 54-204, 1946.

[21] Dubos, Davis. — *Journ. Exper. Med.*, 83-409, 1946.

[22] Dubos, Gardner, Middlebrock. — *Amer. Revue of Tuberculosis*, 4, 334, 1947.

[23] Meyer (André) et Galland. — Techniques pratiques de recherche de la streptomycino-résistance des bacilles tuberculeux, *Rev. de la Tuberculose*, 13, 1949.

[24] Williston (Elisabeth), Youmans. — Factors affecting the sensitivity in vitro of Tubercle bacilli to Streptomycin, *Amer. Revue of Tuberculosis*, 59-336, 1949.

[25] Youmans et Karlson. — Streptomycin sensitivity of Tubercle bacilli, *Amer. Revue of Tuberculosis*, juin 1947.

[26] Froyez (Robert), Mme Froyez-Rœderer. — Laboratoire et Streptomycine, *Sem. des Hôpitaux*, 1527, mai 1949.

[27] Feldman, Karlson et Hinshaw. — Streptomycin resistant tubercle bacilli, *Amer. Revue of Tuberculosis*, 57-162, février 1948.

[28] Feldman. — A scheme for numerical recording of tuberculosis changes in experimentally infected guinea pigs, *Amer. revue of Tuberculosis*, 48, octobre 1943.

[29] Steenken, Wolinsky. — Streptomycin in experimental tuberculosis. Response in guinea pigs infected with strains of warying degrees of streptomycin resistance, *Amer. Revue of Tuberculosis,* 58-353, 1948.

[30] Youmans, Williston. — Effect of streptomycin on experimental infections produced in mice with streptomycin resistant strains of M. tuberculosis var. Hominis, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.,* 33-131, 1946.

[31] Streptomycin in treatment of Tuberculosis, *Journ. of the American medical Association,* 138-584, oct. 1948.

[32] *Minutes of the Sixth Streotomycin conference of the veterans Administration,* octobre 1948.

[33] Howard et collaborateurs. — The role of Pulmonary cavitation in the development of bacterial resistance to streptomycin, *Amer. Revue Tuberculosis,* 5-59-391, 1949.

[34] Mitchel. — The relation of cavity to the developpment of Streptomycin resistant tubercle bacilli in pulmonary tuberculosis, *New England Journ. of Med.,* 241-450, septembre 1949.

[35] Etienne Bernard, Kreis, M^lle^ Lotte, Paley et M^lle^ Fossé. — Sur la streptomycinothérapie des cavernes tuberculeuses. Résultats immédiats et tardifs. *Rev. de la Tuberculose,* 14-3, 1950.

[36] Bourgeois (Pierre), Canetti, Genevrier et Colle. — L'action de la Streptomycine sur les tuberculoses cavitaires, *Rev. de la Tuberculose,* 14-15, 1950.

[37] Streptomycin treatment of tuberculous meningitis. Streptomycin in tuberculosis, *Comittee Med. Research Council. Lancet,* 582, avril 1948.

[38] Klein et Kimmelman. — Developpement of Streptomycin resistance of the shigellae, *Journ. Bact.,* 51-581, mai 1946.

[39] Klein et Kimmelman. — Role of spontaneous variants in acquisitions of Streptomycin resistance by shigellae, *Journ. Bact.,* 52-471, octobre 1946.

[40] Alexander et Leidy. — Mode of action of streptomycin on type b. h. influenzae. Origin of resistant organisms, *Journ. Exp. Med.,* 4-329, avril 1947.

[41] Alexander et Leidy. — Mode of action of streptomycin on type b. h. influenzae nature of resistant variants, *Journ. Exp. Med.,* 6-607, juin 1947.

[42] Marjorie (Pyle). — Relative numbers of resistant tubercle bacilli in sputa of patients before and during treatment with streptomycin, *Proc. of the staff Meeting Mayo Clinic,* 22-465, octobre 1947.

[43] Jensen. — Biological studies on streptomycin therapy, *Acta tub. scand.,* 31-42, 1949.

[44] Wolinsky, Reginster et Steenken. — Drug resistant tubercle bacilli in patients under treatment with streptomycin, *Amer. Rev. Tuberculosis*, 58-334, 1948.

[45] Tapie (Jean), Monnier, Garipuy, Delaude et Bouissou. — La ponction orbitaire de Beriel et l'injection de Streptomycine par la fente sphénoïdale dans le traitement de la méningite tuberculeuse, *Bull. et Mém. de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*, 1950 (sous presse).

[46] Karlson, Pfuetze, Carr, Feldman et Hinshaw. — The effect of combined Therapy with streptomycin P. A. S. and promin on the emergence of streptomycin resistant tubercle bacilli a preliminary report, *Proc. of the Staff Meeting of the Mayo Clinic*, 25-85, février 1949.

[47] Gernez-Rieux, Breton, Delwaulle. — Valeur des tests actuels de streptomycino-résistance pour la conduite du traitement de la tuberculose pulmonaire par la Streptomycine, *Rev. de la Tuberculose*, 14-35, 1950.

[48] Coletsos. — Représentation schématique de la Streptomycine et de l'installation de la streptomycino-résistance dans la tuberculose pulmonaire, *Rev. de la Tuberculose*, 13-898, 1949.

[49] Bariety et Lesobre. — Remarques sur le traitement par la Streptomycine de la tuberculose pulmonaire, *Rev. de la Tuberculose*, 14-8, 1950.

[50] Bernard (Etienne), Kreis, M^lle^ Lotte et Mantoux. — Les adénopathies cervicales des tuberculoses miliaires traitées par la streptomycine et leur forme phagédénique, *Soc. Méd. des Hôpitaux de Paris*, 65-50, 1949.

[51] Baudot, Barrié, Dalous, Cassagneau, Le Tallec. — Un an de Streptomycine dans le traitement de la tuberculose. Commentaires et synthèse des résultats obtenus chez 320 malades. *Réunion de Pneumologie du Sud-Ouest*, 30 avril 1949.

[52] Lehman (Jorgen). — Para-amino-salicylic acid in the treatment of the tuberculosis, *Lancet*, 1-15, 1946.

[53] Youmans. — The effect of para-amino-salicylic acid in vitro and in vivo on virulent human type of tubercle bacilli, *Quart. bull. Northwcrstern Un. M. School*, 20-420, 1946.

[54] Feldman, Karlson, Hinshaw. — Para-amino-salicylic acid in experimental tuberculosis in guinea pigs, *Proc. Staff Meeting Mayo Clinic*, 22-473, octobre 1947.

[55] Feldman, Karlson, Carr, Hinshaw. — Parenteral administration of para-amino-salicylic acid in experimental tuberculosis, *Proc. Staff Meeting Mayo Clinic*, 24-220, avril 1949.

[56] Vallentin, Gylfe. — Kliniska erfarenheter vid behandlingen av lungtuberkulos med P.A.S., Swenska Clinical Trials, *Lancet*, 2-871, décembre 1947.

[57] Carstensen Bo et Sjölin, Stig. — Para-amino-salicylsyra vid lugtuberkulos med sekundar tarmtuberkulos Svenska Laktidning, 45-729, avril 1948.

[58] Hurni. — Gibt es eine Gevrohnung en p. amino-salicylsaure? *Experientia*, 5-128, 1949.

[59] Eastlake, Lesmore and Barach. — Use of para-omino-salicylic acid in chronic pulmonary tuberculosis, *Dis. of the chest*, 16-1, 1949.

[60] Widstrom and Swedberg. — Données expérimentales dans la chimiothérapie de la tuberculose, *Le Poumon*, 5-225, 1949.

[61] Swedberg et Widstrom. — Treatment of experimental tuberculosis in mice and guinea pigs with para-amino-salicylic acid and streptomycin, *Acta Med. Scandinavica*, 131-116, 1948.

[62] Sweany (Henry) (Chicago Illinois). — Cité par Karlson dans The occurence of tubercle bacilli resistant to para-amino-salicylic acid, *Diseases of the chest*, 16-667, 1949.

[63] Odelberg (Axel) (Ostersund, Suède). — Cité par les mêmes auteurs.

[64] Karlson, Delaude, Feldman et Carr. — The effect of para-amino-salicylic Acid on tuberculosis in guinea pigs infected with tubercle bacilli resistant in vitro to P.A.S., *Proc. of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 24-544, octobre 1949.

[65] Karlson, Delaude, Carr, Pfuetze, Feldman. — The occurence of tubercle bacilli resistant to P.A.S., *Diseases of the chest*, 16-667, 1949.

[66] Spendlove et collaborateurs. — Stimulation de la croissance d'une souche de bacilles tuberculeux par la Streptomycine, *Public health report U. S. A.*, 63-177, sept. 1948.

[67] Laenert, Hobby. — Streptomycin dependant strains of mycobacterium tuberculosis, *Amer. Revue of Tuberculosis*, 59-219, 1949.

[68] Tison. — La Streptomycino-résistance du bacille tuberculeux mesurée in vitro correspond-elle à une réalité clinique; est-elle définitivement acquise, *Bull. et Mémoires de la Société Méd. de Passy*, 28-66, 1949.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 11

BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT A LA STREPTOMYCINE 15

I — TECHNIQUES DE MISE EN ÉVIDENCE 15

Tests pratiqués directement à partir du produit pathologique 16

1 - In vitro 16

2 - Sur l'animal 18

Tests pratiqués à partir d'une souche isolée par primo-culture 19

1 - Milieux liquides 20

2 - Milieux solides 22

II — CARACTÈRES DES BACILLES RÉSISTANT A LA STREPTOMYCINE 25

III — CIRCONSTANCES D'APPARITION DES BACILLES TUBERCULEUX STREPTOMYCINO - RÉSISTANTS 30

IV — INCIDENCES CLINIQUES ET PARADOXES DES RÉSULTATS FOURNIS par les TESTS DE SENSIBILITÉ A LA STREPTOMYCINE 36

BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT AU P. A. S. 41

I — TECHNIQUE DE MISE EN ÉVIDENCE 43

II — CARACTÈRES DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT AU P. A. S. 46

III — CIRCONSTANCES D'APPARITION DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANT AU P. A. S. 49

IV — INCIDENCES CLINIQUES DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES TESTS DE SENSIBILITÉ AU P. A. S. . 50

BACILLES RÉSISTANT SIMULTANÉMENT A LA STREPTOMYCINE ET AU P. A. S. 51

CONCLUSIONS 53

BIBLIOGRAPHIE 55